

## РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Барбараш О. Л., Головкин А. С., Понасенко А. В., Кутихин А. Г., Жидкова И. И., Хуторная М. В., Салахов Р. Р., Барбараш Л. С.

**Цель.** Установить наличие ассоциаций между полиморфными вариантами генов Toll-подобных рецепторов с инфарктом миокарда (ИМ), острым нарушением мозгового кровообращения (ОНМК) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС).

**Материал и методы.** В исследование включено 292 пациента с ИБС, с наличием в анамнезе перенесенных ИМ, ОНМК. Изучены ассоциации 8 полиморфных локусов 4 генов: *TLR1* (rs5743551 и rs5743611), *TLR2* (rs3804099 и rs5743708), *TLR4* (rs4986790 и rs4986791), *TLR6* (rs3775073 и rs5743810).

**Результаты.** Определена ассоциация аллеля С полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* с повышенным риском более раннего начала ИБС (в возрасте моложе 55 лет). Гетерозиготный (A/G) генотип полиморфизма rs5743810 *TLR6* является протективным в отношении риска более раннего дебюта ИБС (в возрасте моложе 55 лет). Гетерозиготный (C/T) генотип полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* ассоциирован с повышенным риском развития ОНМК у пациентов с ИБС. Выявлены ассоциации между полом, возрастом пациентов и сердечно-сосудистыми осложнениями по полиморфизмам генов TLRs: мужчины, больные ИБС, гомозиготные по минорному аллелю генотипа (C/C) полиморфизма rs3804099 гена *TLR2*, имеют сниженный риск развития ИМ независимо от возраста; гетерозиготный (C/T) генотип полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* ассоциирован с увеличением риска развития ОНМК у пациентов с ИБС в возрасте старше 55 лет независимо от гендерных различий; гетерозиготный (T/C) генотип полиморфизма rs3775073 гена *TLR6* ассоциирован с повышенным риском развития ИМ в возрасте моложе 55 лет у пациентов с ИБС независимо от гендерных различий.

**Заключение.** Установлены ассоциации полиморфных вариантов генов Toll-подобных рецепторов с развитием осложнений атеросклероза (ОНМК, ИМ) у пациентов с ИБС.

Российский кардиологический журнал 2015, 12 (128): 72–79  
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2015-12-72-79>

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, острое нарушение мозгового кровообращения, атеросклероз, Toll-подобные рецепторы, полиморфизм генов.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия.

Барбараш О. Л. — д.м.н., профессор, директор, Головкин А. С. — д.м.н., зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии, Понасенко А. В. — к.м.н., исполняющий обязанности зав. лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, Кутихин А. Г. — м.н.с. лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, Жидкова И. И.\* — врач-кардиолог, аспирант, Хуторная М. В. — м.н.с. лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, Салахов Р. Р. — м.н.с. лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, Барбараш Л. С. — г.н.с., академик РАН.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
 Irina04046@yandex.ru

АГ — артериальная гипертензия, ДИ — доверительный интервал, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИИ — ишемический инсульт, ИМ — инфаркт миокарда, ЛПС — липополисахарид, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ОШ — отношение шансов, СЖК — свободные (насыщенные) жирные кислоты, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ССО — сердечно-сосудистые осложнения, ТИА — транзиторная ишемическая атака, ФК — функциональный класс, ФР — факторы риска, ХСН — хроническая сердечная недостаточность, АИС — информационный критерий Акаике (Akaike information criterion), HPS-70 — белки теплового шока-70, IL-6 — интерлейкин 6, IL-10 — интерлейкин 10, NF-kB — транскрипционный ядерный фактор, PAMPs — патоген-ассоциированные молекулярные “образы” (pathogen-associated molecular patterns), PRRs — “образы” патогенов (pattern recognition receptors), TLRs — Toll-подобные рецепторы (toll-like receptors), TNF $\alpha$  — фактор некроза опухоли  $\alpha$ .

Рукопись получена 20.11.2014  
 Рецензия получена 08.12.2014  
 Принята к публикации 15.12.2014

## THE ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS POLYMORPHISM IN ATHEROSCLEROSIS COMPLICATIONS DEVELOPMENT

Barbarash O. L., Golovkin A. S., Ponasenko A. V., Kutikhin A. G., Zhidkova I. I., Khutornaya M. V., Salakhov R. R., Barbarash L. S.

**Aim.** To reveal the association of polymorphic types of Toll-like receptor genes with myocardial infarction (MI), stroke in patients with coronary heart disease (CHD).

**Material and methods.** Totally 292 patients studied, with CHD and anamnesis of stroke and/or MI. The association of 8 polymorphic loci of 4 genes were studied: *TLR1* (rs5743551 & rs5743611), *TLR2* (rs3804099 & rs5743708), *TLR4* (rs4986790 & rs4986791), *TLR6* (rs3775073 & rs5743810).

**Results.** The association of allele C of polymorphism rs5743551 gene *TLR1* is associated with higher risk of earlier CHD onset (younger than 55 y.o.). Heterozygous (A/G) genotype of polymorphism rs5743810 *TLR6* is protective against the risk of earlier CHD onset (younger than 55 y.o.). Heterozygous (C/T) genotype of polymorphism rs5743551 gene *TLR1* is associated with higher risk of stroke in CHD patients. The associations revealed with age, gender and cardiovascular complications by polymorphisms of TLR genes: males, having CHD, homozygous by minor allele (C/C) of polymorphism rs3804099 gene *TLR2*, have reduced risk of MI development not related to age; heterozygous (C/T) genotype of polymorphism

rs5743551 of gene *TLR1* is associated with the increased risk of stroke in CHD patients older than 55 y.o. not depending on gender; heterozygous (T/C) genotype of polymorphism rs3775073 gene *TLR6* is associated with increased risk of MI in younger than 55 y.o. patients with CHD not related to gender.

**Conclusion.** Some associations of polymorphic Toll-like receptors genes with the development of atherosclerosis complications (MI, stroke) in CHD are revealed.

Russ J Cardiol 2015, 10 (126): 72–79  
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2015-10-72-79>

**Key words:** ischemic heart disease, stroke, atherosclerosis, Toll-like receptors, gene polymorphism.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia.

Атеросклероз является мультифакториальным прогрессирующим заболеванием, которое сопровождается различными сердечно-сосудистыми осложнениями (ССО) — такими, как инфаркт миокарда (ИМ), транзиторная ишемическая атака (ТИА), острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) [1]. В последние годы активно изучается роль локального (местного) и генерализованного воспаления в патогенезе атеросклероза, особое внимание уделяется воспалительному повреждению сосудистой стенки. Одновременно с этим имеются доказательства участия в патогенезе атеросклероза рецепторов врожденного иммунитета (Toll-подобных рецепторов, Toll-like receptors, TLRs). Развитие ИМ и ОНМК по ишемическому типу сопровождается повышением уровня циркулирующих маркеров иммунного ответа и воспаления: фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и интерлейкина 10 (IL-10), а также уровня экспрессии белка теплового шока-70 (HSP-70), фибриногена, являющихся эндогенными лигандами для TLR4. При этом известно, что уровень экспрессии и функциональная активность Toll-подобных рецепторов на поверхности клеток являются генетически детерминированными [1].

Таким образом, общим звеном в патогенезе атеросклероза и связанных с ним ССО (ОНМК и ИМ) является хроническое воспаление с участием врожденного и адаптивного механизмов иммунной защиты. Вместе с тем, данные о роли полиморфизма генов Toll-подобных рецепторов в реализации ССО атеросклероза противоречивы и мало изучены.

Цель исследования — установить наличие ассоциаций между полиморфными вариантами генов Toll-подобных рецепторов с ИМ, ОНМК у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС).

### Материал и методы

В исследование включены 292 пациента с ИБС, проходивших подготовку к операции шунтирования коронарных артерий на базе НИИ КПССЗ г. Кемерово с 2011 по 2012гг. Все участники исследования принадлежали к русской этнической группе. Решение о включении больного в исследование осуществлялось после подписания информированного согласия. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института.

Критериями включения в исследование были: наличие в анамнезе верифицированного диагноза ИБС, ОНМК, ИМ; принадлежность к русской национальности; проживание на территории Кемеровской области и наличие подписанного информированного согласия на проведение исследования. Критериями исключения являлись: злокачественные новообразования в анамнезе, сопутствующие аутоиммунные заболевания, острые инфекционные заболевания или обострение хронических, а также психические заболевания.

В исследование были включены 239 (81,85%) мужчин и 53 (18,15%) женщины, медиана возраста составила 58,00 [54,00;63,00] лет (от 40 до 70 лет включительно). Большинство пациентов имело традиционные факторы сердечно-сосудистого риска. Так, артериальная гипертензия (АГ) встречалась у 262 (89,73%) пациентов, перенесенный ИМ — у 224 (76,71%), курение в анамнезе — у 196 (67,12%) больных, дислипидемия — у 227 (77,74%) человек, ОНМК — у 31 (10,62%).

Согласно классификации Канадской ассоциации кардиологов, стенокардия I-II ФК была выявлена у 175 (59,93%) пациентов, III-IV ФК — у 117 (40,07%). Дебют ИБС в возрасте раньше 40 лет был выявлен у 12 (4,10%) человек; в возрасте 40-50 лет — у 74 (25,30%) человек и в возрасте старше 50 лет — у 206 (70,50%) человек. Медиана длительности ИБС составила 3,00 [1,00;7,00] года.

Диагноз ИБС устанавливали на основании национальных клинических рекомендаций “Диагностика и лечение больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST”, разработанных комитетом экспертов Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) по стабильной стенокардии (2008г), наличия ангинозных болей в грудной клетке, данных анамнеза, а также лабораторных и инструментальных методов обследования. Диагноз перенесенного ИМ устанавливался согласно критериям ВНОК: на основании клинических (синдрома болей в грудной клетке, возникших в покое, продолжительностью более 20 минут), электрокардиографических (ЭКГ), биохимических (повышения уровней биохимических маркеров некроза миокарда (сердечного тропонина Т и КК-МВ) в сыворотке крови) и данных анамнеза. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) по классификации Нью-Йоркской Ассоциации сердца ФК I-II выявлена у 210 (71,90%) человек, ФК III-IV — у 82 (28,10%) человек. Диагноз перенесенного ранее ОНМК устанавливался на основании данных анамнеза и медицинской документации.

Среди обследованных пациентов (292 человек) выделены группы в зависимости от перенесенных ИМ и ОНМК.

Первое деление на группы произвели в зависимости от наличия/отсутствия у пациента в анамнезе ИМ. По данному показателю в первую группу вошли 68 пациентов (47 (69,12%) мужчин и 21 (30,88%) женщины), в возрасте 59,00 [55,00;63,00] лет, не имевших в анамнезе ИМ. Во вторую группу с ИМ включены 224 человека (192 (85,71%) мужчины и 32 (14,29%) женщины), в возрасте 58,00 [53,00;62,00] лет.

Затем всех пациентов разделили на две группы по критерию принесенного ОНМК. В третью группу был включен 261 пациент (215 (82,38%) мужчин и 46 (17,62%) женщин), средний возраст 58,00 [53,00;62,00] года, не имевших на момент обследования ОНМК в анамнезе. Пациенты с перенесенным ОНМК вошли

Таблица 1

**Исходные клиничко-anamнестические характеристики групп пациентов в зависимости от наличия в анамнезе ИМ**

	I группа, n= 68 (23,29%)	II группа, n=224 (76,71%)	p
Женщины, n (%)	21 (30,88)	32 (14,29)	0,042
Мужчины, n (%)	47 (69,12)	192 (85,71)	
Медиана возраста, лет	59,00 [55,00;63,00]	58,00 [53,00;62,00]	0,085
Медиана дебюта ИБС, лет	56,50 [50,00;61,00]	53,00 [48,00;58,00]	0,005
Медиана длительности ИБС, лет	2,00 [1,00;6,00]	3,00 [1,00;7,00]	0,196
Медиана SYNTAX, баллов	19,00 [13,00;27,00]	20,50 [14,00;27,00]	0,094
Медиана длительности АГ, лет	8,00 [3,00;15,00]	6,00 [2,00;6,50]	0,316
Стенокардия ФК I-II, n (%)	34 (50,00)	119 (53,13)	0,628
Стенокардия ФК III-IV, n (%)	34 (32,30)	105 (46,88)	
ХСН ФК I-II, n (%)	42 (61,76)	168 (75)	0,033
ХСН ФК II-III, n (%)	26 (38,24)	56 (25)	
С ОНМК, n (%)	9 (13,24)	22 (9,82)	0,922
С НУО, n (%)	24 (35,29)	63 (28,13)	0,187
С МФА, n (%)	57 (83,82)	196 (87,50)	0,437
С АГ, n (%)	63 (92,60)	199 (88,79)	0,365
С дислипидемией, n (%)	54 (79,41)	173 (77,23)	0,705
Курящие, n (%)	41 (60,30)	154 (68,75)	0,171

Таблица 2

**Исходные клиничко-anamнестические характеристики групп пациентов в зависимости от наличия в анамнезе ОНМК**

Показатели, медиана	III группа, n=261 (89,38%)	IV группа, n= 31 (10,62%)	p
Женщины, n (%)	46 (17,62)	6 (19,35)	0,854
Мужчины, n (%)	215 (82,38)	25 (80,65)	
Медиана возраста, лет	58,00 [53,00;62,00]	60,00 [55,00;64,00]	0,269
Медиана дебюта ИБС, лет	53,00 [48,00;58,00]	54,00 [51,00;58,00]	0,511
Медиана длительности ИБС, лет	3,00 [1,00;7,00]	3,00 [1,00;7,00]	0,745
Медиана SYNTAX, баллов	19,50 [14,00;26,50]	20,50 [14,00;26,50]	0,885
Медиана длительности АГ, лет	8,00 [3,00;10,00]	7,00 [2,00;15,00]	0,908
Стенокардия ФК I-II, n (%)	135 (51,72)	18 (58,06)	0,851
Стенокардия ФК III-IV, n (%)	126 (48,28)	13 (41,94)	
ХСН ФК I-II, n (%)	188 (72,03)	22 (70,97)	0,613
ХСН ФК II-III, n (%)	73 (27,97)	9 (29,03)	
С ИМ, n (%)	202 (77,39)	22 (70,97)	0,922
С НУО, n (%)	77 (29,50)	10 (32,26)	0,754
С МФА, n (%)	226 (86,59)	27 (87,10)	0,753
С АГ, n (%)	233 (89,27)	29 (93,55)	0,582
С дислипидемией, n (%)	207 (79,31)	20 (64,52)	0,061
Курящие, n (%)	172 (65,90)	24 (77,42)	0,197

в четвертую группу: 31 мужчина (25 (80,65%) и 6 женщин (19,35%), средний возраст пациентов составил 60,00 [55,00;64,00] года. Сочетание ИМ и ОНМК выявлено у 24 (10,71%) человек, однако отдельной группы не выделено, т.к. данная выборка не репрезентативна. В таблицах 1 и 2 представлены общие клиничко-anamнестические характеристики обследованных пациентов.

Для проведения исследования выделяли геномную ДНК методом фенол-хлороформной экстракции с протеиназой K по модификации Smith, et al. из цельной

венозной крови. Генотипирование проводили по технологии Taqman с использованием флуоресцентно-меченных зондов производства Applied Biosystems (США). Концентрации и качественные характеристики выделенной ДНК проверяли с использованием спектрофотометра NanoDrop-2000 (TFS, США). Тремя основными критериями для выбора однонуклеотидных полиморфизмов были: частота минорного аллеля  $\geq 5\%$  в русской популяции согласно HarMap; предполагаемые или доказанные на молекулярном уровне функциональные последствия, малое количество или отсут-

Таблица 3

## Связь аллельных локусов генов Toll-подобных рецепторов с риском развития ОНМК и дебютом ИБС

rs5743551 гена <i>TLR1</i> , n=290						
Модели наследования	Генотипы	III группа	IV группа	ОШ (95% ДИ)	p	AIC
Кодоминантная	T/T	175 (67,6%)	15 (48,4%)	1,00	0,092	200,6
	C/T	76 (29,3%)	15 (48,4%)	2,37 (1,10-5,13)		
	C/C	8 (3,1%)	1 (3,2%)	1,44 (0,17-12,43)		
Доминантная	T/T	175 (67,6%)	15 (48,4%)	1,00	0,033	198,8
	C/T-C/C	84 (32,4%)	16 (51,6%)	2,28 (1,07-4,86)		
Рецессивная	T/T-C/T	251 (96,9%)	30 (96,8%)	1,00	0,98	203,4
	C/C	8 (3,1%)	1 (3,2%)	1,03 (0,12-8,56)		
Овердоминантная	T/T-C/C	183 (70,7%)	16 (51,6%)	1,00	0,031	198,7
	C/T	76 (29,3%)	15 (48,4%)	2,33 (1,09-4,97)		
Лог-аддитивная	–	–	–	1,81 (0,97-3,38)	0,067	200
rs5743551 <i>TLR1</i> , n=290						
Модели наследования	Генотипы	Дебют ИБС после 55 лет	Дебют ИБС до 55 лет	ОШ (95% ДИ)	p	AIC
Кодоминантная	T/T	78 (68,40%)	109 (61,90%)	1,00	0,023	248,7
	C/T	35 (30,70%)	58 (33,00%)	1,22 (0,64-2,33)		
	C/C	1 (0,90%)	9 (5,10%)	11,69 (1,35-101,38)		
Доминантная	T/T	78 (68,40%)	109 (61,90%)	1,00	0,2	252,7
	C/T-C/C	36 (31,60%)	67 (38,10%)	1,50 (0,81-2,78)		
Рецессивная	T/T-C/T	113 (99,10%)	167 (94,90%)	1,00	0,0073	247,1
	C/C	1 (0,90%)	9 (5,10%)	10,96 (1,28-93,98)		
Овердоминантная	T/T-C/C	79 (69,30%)	118 (67,00%)	1,00	0,81	254,3
	C/T	35 (30,70%)	58 (33,00%)	1,08 (0,57-2,04)		
Лог-аддитивная	–	–	–	1,71 (1,01-2,90)	0,046	250,3
rs5743810 <i>TLR6</i> , n=291						
Модели наследования	Генотипы	Дебют ИБС после 55 лет	Дебют ИБС до 55 лет	ОШ (95% ДИ)	p	AIC
Кодоминантная	G/G	40 (35,10%)	83 (46,90%)	1,00	0,12	252
	A/G	61 (53,50%)	67 (37,90%)	0,52 (0,27-0,99)		
	A/A	13 (11,40%)	27 (15,20%)	0,90 (0,35-2,32)		
Доминантная	G/G	40 (35,10%)	83 (46,90%)	1,00	0,084	251,3
	A/G-A/A	74 (64,90%)	94 (53,10%)	0,59 (0,32-1,07)		
Рецессивная	G/G-A/G	101 (88,60%)	150 (84,80%)	1,00	0,59	254
	A/A	13 (11,40%)	27 (15,20%)	1,27 (0,53-3,08)		
Овердоминантная	G/G-A/A	53 (46,50%)	110 (62,10%)	1,00	0,039	250,1
	A/G	61 (53,50%)	67 (37,90%)	0,53 (0,29-0,97)		
Лог-аддитивная	–	–	–	0,80 (0,51-1,25)	0,31	253,3

вие исследований по определению роли влияния данных полиморфизмов на ОНМК и ИМ.

Для выбора полиморфизмов использовались базы данных NCBI dbSNP; SNPinfo. Исследовали 8 аллельных вариантов 4 генов системы TLRs: *TLR1* (rs5743551 и rs5743611), *TLR2* (rs3804099 и rs5743708), *TLR4* (rs4986790 и rs4986791), *TLR6* (rs3775073 и rs5743810). Анализ ассоциаций проводился с учетом поправки на пол и возраст (моложе и старше 55 лет).

Математическая обработка количественных показателей проводилась с использованием статистического пакета программы Statistica® for Windows 6.0, (StatSoftInc., США). Две независимые группы по признаку сравнивались с помощью U-критерия Манна-Уитни. Анализ качественных данных (соответствие распределения аллелей закону Харди-Вайн-

берга, частота генотипов и гаплотипов, анализ ассоциаций) произведен при помощи интерактивной программы SNPStats (Institut Català d'Oncologia; Universidad Autònoma de Barcelona, Испания).

Распределение частот генотипов во всех группах соответствовало равновесию Харди-Вайнберга (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) с критическим значением вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу об отсутствии данного равновесия при  $p=0,05$ . Расчет показателей отношения шансов (ОШ) с 95%-ми доверительными интервалами (ДИ) для групп и подгрупп проводился по всем пяти моделям наследственности (кодоминантной, доминантной, рецессивной, овердоминантной и лог-аддитивной). Релевантность моделей наследственности для каждого конкретного полиморфизма оценивалась

**Таблица 4**  
**Связь аллельных локусов генов Toll-подобных рецепторов с риском развития ИМ, ОНМК (с поправкой на возраст)**

rs5743551 гена <i>TLR1</i> , n=290					
Возраст	Генотипы	III группа	IV группа	ОШ (95% ДИ)	р
Старше 55 лет	T/T	112 (69,56)	11 (47,83)	1,00	0,043
	C/T	44 (27,33)	11 (47,83)	2,55 (1,03-6,30)	
	C/C	5 (3,11)	1 (4,35)	2,03 (0,22-19,05)	
Моложе 55 лет	T/T	63 (64,29)	4 (50)	1,00	0,33
	C/T	32 (32,65)	4 (50)	1,97 (0,46-8,39)	
	C/C	3 (3,06)	–	–	
rs3775073 гена <i>TLR6</i> , n=291					
Возраст	Генотипы	I группа	II группа	ОШ (95% ДИ)	р
Старше 55 лет	T/T	14 (30,43)	41 (29,71)	1,00	0,89
	T/C	24 (52,18)	70 (50,72)	0,92 (0,42-2,01)	
	C/C	8 (17,39)	27 (19,57)	1,06 (0,38-2,94)	
Моложе 55 лет	T/T	12 (54,54)	24 (28,24)	1,00	0,047
	T/C	7 (31,82)	41 (48,23)	3,17 (1,08-9,27)	
	C/C	3 (13,64)	20 (23,53)	3,43 (0,84-14,07)	

**Таблица 5**  
**Связь аллельных локусов Toll-подобных рецепторов с риском развития ИМ (с поправкой на пол)**

rs3804099 гена <i>TLR2</i> , n=291					
Пол	Генотипы	I группа	II группа	ОШ (95% ДИ)	р
Женщины	T/T	9 (42,86)	8 (25,81)	1,00	0,31
	C/T	7 (33,33)	15 (48,38)	2,82 (0,74-10,72)	
	C/C	5 (23,81)	8 (25,81)	2,30 (0,51-10,33)	
Мужчины	T/T	14 (29,79)	92 (47,92)	1,00	0,011
	C/T	21 (44,68)	75 (39,06)	0,52 (0,25-1,11)	
	C/C	12 (25,53)	25 (13,02)	0,27 (0,11-0,67)	

по информационному критерию Акаике (Akaike information criterion, AIC), за наиболее релевантную модель принималась та, для которой значение AIC было наименьшим. За референтный генотип принимался гомозиготный генотип с большей частотой. Критическое значение вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу об отсутствии влияния полиморфизма на риск развития заболевания — р принималось  $\leq 0,05$ . Для предотвращения влияния эффекта множественных сравнений использован критерий перестановок (permutation test).

**Результаты**

В результате анализа клинико-анамнестических данных определена достоверная разница в дебюте ИБС у пациентов без ИМ и с ИМ [56;50 [50,00;61,00] против 53,00 [48,00;58,00] лет,  $p=0,005$ ]. Пациенты с ИМ имели более ранний возраст дебюта ИБС, по сравнению с пациентами без такового. Полученные данные приведены в таблице 1.

Аллель С полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* статистически значимо ассоциирован с повышенным риском более раннего начала ИБС (в возрасте моложе 55 лет) в соответствии с лог-аддитивной моделью наследования (ОШ=1,71; 95% ДИ=1,01-2,90,  $p=0,046$ ). Гетерозиготный (A/G) генотип полиморфизма rs5743810 *TLR6* статистически значимо ассоциирован со сниженным риском более раннего дебюта ИБС (в возрасте моложе 55 лет) в соответствии с овердоминантной моделью наследования (ОШ=0,53; 95% ДИ=0,29-0,97,  $p=0,039$ ) (табл. 3).

С повышенным риском развития ОНМК выявлена статистически значимая ассоциация гетерозиготного генотипа (C/T) полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* в соответствии с овердоминантной моделью наследования (ОШ=2,33; 95% ДИ=1,09-4,97,  $p=0,031$ ) у пациентов с ИБС (табл. 3).

Дальнейший анализ по возрастным подгруппам (моложе и старше 55 лет) позволил обнаружить ассоциацию гетерозиготного (C/T) генотипа полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* с увеличением риска развития ОНМК у пациентов с ИБС в возрасте старше 55 лет (ОШ=2,55; 95% ДИ=1,03-6,30,  $p=0,043$ ) независимо от гендерных различий (табл. 4).

Анализ генных ассоциаций показал статистически достоверную ассоциацию гетерозиготного (T/C) генотипа полиморфизма rs3775073 гена *TLR6* с повышенной вероятностью развития ИМ в возрасте моложе 55 лет (ОШ=3,17; 95% ДИ=1,08-9,27,  $p=0,047$ ) у пациентов с ИБС независимо от гендерных различий (табл. 4).

Гомозиготный (C/C) генотип *TLR2* в позиции rs3804099 был статистически значимо ассоциирован со снижением риска развития ИМ у мужчин с ИБС (ОШ=0,27; 95% ДИ=0,11-0,67,  $p=0,011$ ) независимо от возраста (табл. 5).

Достоверной ассоциативной связи между гаплотипами, содержащим восемь минорных аллелей локусов *TLR1* (rs5743551 и rs5743611), *TLR2* (rs3804099 и rs5743708), *TLR4* (rs4986790 и rs4986791), *TLR6* (rs3775073 и rs5743810), и повышением риска развития ИМ не установлено.

**Обсуждение**

Одним из важных свойств иммунной системы является способность к распознаванию чужеродных веществ и развитию воспалительных реакций в ответ на их воздействие. Эта функция осуществляется благодаря взаимодействию врожденного и приобретенного компонентов иммунитета. Механизмы врожденной защиты представляют собой разнообразные комплексы и их молекулы, рецепторы, которые присутствуют на различных клетках и выполняют одинаковые функции [1]. Таким образом, врожденный иммунитет обеспечивает специфическое распознавание патогенов с помощью ограниченного числа генетически

запрограммированных рецепторов, воспринимающих “образы” патогенов (pattern recognition receptors PRRs), взаимодействующих с патоген-ассоциированными молекулярными “образами” (pathogen-associated molecular patterns PAMPs) — такими, как ДНК и РНК бактерий и вирусов, липополисахариды бактериальной стенки [1]. В настоящее время известно несколько семейств сигнальных PRRs, локализующихся как в цитозоле, так и на мембранах клетки, однако наибольший интерес в изучении уделяется Toll-подобным рецепторам. Они необходимы для быстрого распознавания инфекционных патогенов (вирусов, бактерий, грибов) посредством экзогенных лигандов с последующей активацией защитных механизмов, а также реализации асептического воспаления за счет эндогенных лигандов (модифицированных ЛПНП, свободных жирных кислот (СЖК), HPS-70, фибриногена, фибронектина). Большинство TLRs экспрессируются как на поверхности иммунно-компетентных клеток, так и на эндотелии сосудов, кардиомиоцитах. В результате активации TLRs происходит индукция синтеза провоспалительных цитокинов и интерферонов, обеспечивающих реализацию реакций врожденного иммунитета, а также осуществляется экспрессия молекул, которые приводят к активации Т-лимфоцитов (развитие адаптивного иммунного ответа) [1].

Эпидемиологические и клинические данные показывают, что хроническое воспаление и инфекция увеличивают риск ИБС и атеросклероза, а также связанных с ними ССО — таких, как инсульт и ИМ [2].

На сегодняшний день известны 13 TLR, из них у человека определено 11, однако их роль в патологии сердечно-сосудистых, особенно цереброваскулярных, заболеваний остается недостаточно изученной [1].

TLR3 распознает вирусную двухцепочечную РНК; TLR4 связывает эндотоксин липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий и является главным рецептором врожденного иммунитета, активация которого сопровождается экспрессией генов цитокинов и других сигнальных пептидов; TLR5 распознает бактериальные белки жгутиков; TLR7, TLR8, TLR9 — нуклеиновые кислоты. Локусы TLR10/TLR1/TLR6 расположены на одной хромосоме, в связи с этим данный комплекс обуславливает иммунный ответ родственных генов. Это означает, что TLR6 может иметь близкую генетическую связь с TLR1, TLR10, которые могут повлиять на передачу сигнала многих TLRs. Так, например, рецептор TLR2 уникален своей способностью образовывать гетеродимеры с TLR1, TLR6 на поверхности цитоплазматической мембраны. Гетеродимер TLR2-TLR6 распознает диацилированные липопептиды грамположительных бактерий и микоплазм, а TLR2-TLR1 — триацилированные липопептиды грамотрицательных бактерий и микоплазм. Гомодимеры TLR1, TLR2 и TLR6 сами функционально

неактивны. Такая особенность рецептора TLR2 обеспечивает широкий диапазон распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, TLR10 может образовывать гетеродимеры с TLR1 или TLR2, но его лиганд в настоящее время неизвестен; TLR11 распознает молекулы уропатогенных бактерий [1].

Атеросклероз крупных сосудов в 70% случаев является наиболее частой причиной ишемического инсульта (ИИ) и ИМ, а процесс воспаления сосудистой стенки — атрибутом всех стадий развития атеросклероза — от его инициации, прогрессирования и перехода атеросклеротической бляшки в нестабильное состояние. Ишемическое событие в миокарде или головном мозге является дополнительным стимулом для активации локального и системного воспаления [1,2].

Так, например, в исследовании Скворцовой В. И. и др. [1] показано, что уровень экспрессии TLR4 на моноцитах достоверно повышается у больных с ИМ и ИИ, начиная с 1-х суток заболевания по сравнению с таковым у пациентов контрольной группы ( $p < 0,05$ ) и к 14 суткам коррелирует с тяжестью состояния больных ИИ ( $r = 0,8$ ;  $p < 0,05$ ). При повреждении ткани миокарда и головного мозга значительно повышается концентрация HSP-70, фибриногена, фибронектина, являющихся эндогенными лигандами для TLR4. Это свидетельствует о сходных механизмах реализации ишемического повреждения миокарда и головного мозга [3]. В кардиомиоцитах наиболее выражен уровень экспрессии TLR2, TLR4. Увеличение уровня циркулирующих TLR2 или TLR4-положительных моноцитов наблюдается при нестабильной стенокардии, остром ИМ и ХСН [4]. У больных с ИМ с подъемом сегмента ST повышенная экспрессия на моноцитах TLR4 является независимым предиктором 30-ти дневных основных неблагоприятных клинических исходов [5]. Oyama JI, et al. [6] продемонстрировали, что после преходящей ишемии (1 ч окклюзии коронарной артерии и 24 ч реперфузии) TLR4-дефицитные мыши имели значительно меньшую зону повреждения при ИМ более, чем в 50% случаев по сравнению с контрольными мышами. Кроме того, у TLR4-дефицитных мышей отмечалась сниженная продукция молекул воспаления (TNF $\alpha$ , интерлейкина 6 (IL-6)) и снижение нейтрофильной инфильтрации. Кардиопротекторное действие также наблюдалось у мышей, дефицитных по TLR2 [6]. Высокая экспрессия TLR4 способствует системной продукции цитокинов при ИМ. Kim SC, et al. [7] измерен уровень белка провоспалительных цитокинов в миокарде и сыворотке крови после ишемического повреждения и показано увеличение его сывороточных уровней (IL-6, TNF $\alpha$ ) в ответ на 1 ч ишемии и 2 ч реперфузии в естественных условиях и у мышей, дефицитных по сигнализации TLR4. Блокирование экспрессии TLR4 на моноцитах приводило к значительному снижению системного воспаления [7].

Изменения в геноме человека могут определять различный характер течения воспалительного ответа и специфических иммунных реакций. Например, гены *TLRs* могут отвечать за способность рецепторов распознавать соответствующие лиганды. Reismann P, et al. [8] не выявили ассоциаций минорных аллелей полиморфизмов rs4986790 (Asp299Gly) и rs4986791 (Thr399Ile) гена *TLR4* с атеросклеротическим инсультом. Аналогичные результаты были получены Norata GD, et al. [9]: показано, что минорные аллели данных полиморфизмов гена *TLR4* не имели связи с повышенным риском инсульта после введения поправки на возраст и пол. В исследовании Park HJ, et al. [10] минорные аллели полиморфизмов rs3804099 (Asn199Asn) и Ser450Ser гена *TLR2* не имели связи с развитием ИИ, но авторы предположили их роль в повышении тяжести данного заболевания. В 2010г Yuan M, et al. [11] в своем исследовании подтвердили полученные ранее результаты об отсутствии связи минорных аллелей полиморфных вариантов Asp299Gly и Thr399Ile гена *TLR4* и риском ИИ в китайской популяции. В исследовании Ameziane N, et al. [12] аллель G полиморфизма Asp299Gly гена *TLR4* ассоциирован с более низким риском развития острых коронарных событий. В исследовании Hernesniemi J, et al. в 2006 году ассоциации аллеля G полиморфизма rs4986790 гена *TLR4* с риском ИМ обнаружено не было [13]. Zee RY, et al. сообщили об отсутствии ассоциаций аллеля G полиморфизма Asp299Gly гена *TLR4* с риском атеросклероза, ИМ и инсульта [14]. Balistreri CR, et al. не обнаружили никаких ассоциаций между минорными аллелями полиморфизмов Arg677Trp и rs5743708 (Arg753Gln) гена *TLR2* и ИМ [15]. Различия в полученных результатах исследований могут быть связаны с тем, что средний возраст пациентов в исследованиях Balistreri CR и Ameziane N в среднем составлял 41-48 лет, а в других исследованиях был значительно выше.

Таким образом, накопленные знания по полиморфизмам генов *TLR* и их связи с ОНМК и ИМ имеют противоречивый характер. В данном исследовании нами был впервые проведен комплексный генетический анализ по 8 полиморфизмам генов — рецепторов врожденного иммунитета — с поправками на пол и возраст.

В нашем исследовании гетерозиготный (Т/С) генотип полиморфизма rs3775073 гена *TLR6* был статистически значимо ассоциирован с повышенным риском развития ИМ в возрасте моложе 55 лет у пациентов с ИБС (ОШ=3,17; 95% ДИ=1,08-9,27, p=0,047) независимо от гендерных различий. Гомозиготный (С/С) генотип rs3804099 гена *TLR2* был статистически значимо ассоциирован со снижением риска развития ИМ у мужчин, больных ИБС (ОШ=0,27; 95% ДИ=0,11-0,67, p=0,011) независимо от пола. Других статистически значимых результатов определения

ассоциаций минорных аллелей полиморфизмов генов *TLR1* (rs5743551 и rs5743611), *TLR2* (rs5743708), *TLR4* (rs4986790 и rs4986791), *TLR6* (rs5743810) с ИМ выявлено не было. Полученные данные согласуются с результатами исследований таких авторов, как Hernesniemi J, et al. [13], Zee RY, et al. [14], Balistreri CR, et al. [15]. Установлено, что *TLR1* и *TLR2* связаны с активацией воспалительных реакций в центральной нервной системе (клетках микроглии, глии, нейронах, астроцитах), а также моноцитах периферической крови [1]. В полученных результатах проведенного исследования гетерозиготный (С/Т) генотип полиморфизма rs5743551 *TLR1* статистически значимо ассоциирован с повышением риска развития ОНМК в соответствии с овердоминантной моделью наследования (ОШ=2,33; 95% ДИ=1,09-4,97, p=0,031) у пациентов с ИБС. Дальнейший анализ по возрастным подгруппам позволил обнаружить ассоциацию гетерозиготного (С/Т) генотипа полиморфизма rs5743551 *TLR1* с увеличением риска развития ОНМК у пациентов с ИБС в возрасте старше 55 лет (ОШ=2,55, 95% ДИ=1,03-6,30, p=0,043) независимо от гендерных различий. Других статистически значимых результатов по определению ассоциаций минорных аллелей полиморфизмов генов *TLR1* (rs5743611), *TLR2* (rs3804099 и rs5743708), *TLR4* (rs4986790 и rs4986791), *TLR6* (rs3775073 и rs5743810) и ОНМК выявлено не было. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, в частности, Norata GD, et al. [9], Park HJ, et al. [10], Yuan M, et al. [11], Zee RY, et al. [14].

Аллель С полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* статистически значимо ассоциирован с повышенным риском более раннего начала ИБС (в возрасте моложе 55 лет) в соответствии с лог-аддитивной моделью наследования (ОШ=1,71; 95% ДИ=1,01-2,90, p=0,046). Гетерозиготный (А/Г) генотип полиморфизма rs5743810 *TLR6* статистически значимо ассоциирован со сниженным риском более раннего дебюта ИБС (в возрасте моложе 55 лет) в соответствии с овердоминантной моделью наследования (ОШ=0,53; 95% ДИ=0,29-0,97, p=0,039).

Других статистически значимых результатов анализа минорных аллелей полиморфизмов генов *TLR1* (rs5743611), *TLR2* (rs3804099 и rs5743708), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs3775073) и раннего (до 55 лет) или позднего (старше 55 лет) дебюта ИБС не выявлено. Таким образом, определение минорного аллеля С полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* может стать возможным маркером, увеличивающим риск неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

### Заключение

Определена ассоциация аллеля С полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* с повышенным риском более ран-

него начала ИБС (в возрасте моложе 55 лет). Гетерозиготный (A/G) генотип полиморфизма rs5743810 *TLR6* является протективным в отношении риска более раннего дебюта ИБС (в возрасте моложе 55 лет). Гетерозиготный (C/T) генотип полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* ассоциирован с повышенным риском развития ОНМК у пациентов с ИБС. Выявлены ассоциации между полом, возрастом пациентов и сердечно-сосудистыми осложнениями по полиморфизмам генов *TLRs*: мужчины, больные ИБС, гомозиготные по минорному

аллелю генотипа (C/C) полиморфизма rs3804099 гена *TLR2*, имеют сниженный риск развития ИМ независимо от возраста; гетерозиготный (C/T) генотип полиморфизма rs5743551 гена *TLR1* ассоциирован с увеличением риска развития ОНМК у пациентов с ИБС в возрасте старше 55 лет независимо от гендерных различий; гетерозиготный (T/C) генотип полиморфизма rs3775073 гена *TLR6* ассоциирован с повышенным риском развития ИМ в возрасте моложе 55 лет у пациентов с ИБС независимо от гендерных различий.

### Литература

- Skvorcova VI, Shurdumova MH, Konstantinova EV. Value of Toll-like receptors in the development of ischemic injury. *Zhurn nevrologii i psikiatrii im SS Korsakova* 2010; 4(2): 12-17. Russian (Скворцова В.И., Шурдумова М.Х., Константинова Е.В. Значение Toll-подобных рецепторов в развитии ишемического повреждения. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2010; 4(2): 12-17).
- Alekperov JeZ, Nadzharov RN. Modern concepts of the role of inflammation in atherosclerosis. *Kardiologija* 2010; 6: 88-91. Russian (Алекперов Э.З., Наджаров Р.Н. Современные концепции о роли воспаления при атеросклерозе. *Кардиология* 2010; 6: 88-91).
- Guo J, Wang SB, Yuan TY, et al. Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation. *Atherosclerosis* 2013; 231: 384-91.
- Foldes G, von Haehling S, Okonko DO, et al. Fluvastatin reduces increased blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2008; 124: 80-5.
- Sheu JJ, Chang LT, Chiang CH, et al. Prognostic value of activated toll-like receptor-4 in monocytes following acute myocardial infarction. *Int Heart J* 2008; 49: 1-11.
- Oyama JI, Blais CX, Liu X et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; 109(6): 784-89.
- Kim SC, Ghanem AH, Stapel H et al. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but nogain in function. *BMC Physiology* 2007; 7: 5.
- Reismann P, Lichy C, Rudofsky G, et al. Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia. *J Neurol* 2004; 251(7): 853-58.
- Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, et al. Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med* 2005; 258(1): 21-7.
- Park HJ, Kim SK, Yun DH, et al. Association of toll-like receptor 2 polymorphisms with National Institute of Health Stroke Scale scores of ischemic stroke patients. *J Mol Neurosci* 2012; 46(3): 536-40.
- Yuan M, Xia J, Ma L, et al. Lack of the Toll-like receptor 4 gene polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in a Chinese population. *Int J Neurosci* 2010; 120(6): 415-20.
- Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, et al. S. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 61-64.
- Hernesniemi J, Lehtimäki T, Rontu R, et al. Toll-like receptor 4 polymorphism is associated with coronary stenosis but not with the occurrence of acute or old myocardial infarctions. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66(8): 667-75.
- Zee RY, Hegener HH, Gould J, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly gene polymorphism and risk of atherothrombosis. *Stroke* 2005; 36: 154-57.
- Balistreri CR, Candore G, Mirabile M, et al. TLR2 and age-related diseases: potential effects of Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms in acute myocardial infarction. *Rejuvenation Res* 2008; 11(2): 293-96.

**Регистрация.** Регистрационные взносы для участия делегатов в работе V Международного форума кардиологов и терапевтов не требуются. При этом все зарегистрированные делегаты получают портфель

участника также без оплаты. Регистрационную форму необходимо выслать в Оргкомитет до 3 марта 2016г по электронному адресу: [registraciya.cardio@gmail.com](mailto:registraciya.cardio@gmail.com).

### РЕГИСТРАЦИОННАЯ ФОРМА

#### V МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ КАРДИОЛОГОВ И ТЕРАПЕВТОВ Москва, 29-31 марта 2016г

Пожалуйста, заполняйте форму печатными буквами

Фамилия \_\_\_\_\_ Имя \_\_\_\_\_

Отчество \_\_\_\_\_ Должность \_\_\_\_\_

Ученая степень \_\_\_\_\_ Ученое звание \_\_\_\_\_

Место работы \_\_\_\_\_

Полный адрес места работы, включая почтовый индекс \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Домашний адрес с индексом \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Телефон: \_\_\_\_\_ служебный, с кодом города \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ домашний, с кодом города \_\_\_\_\_

Факс с кодом города \_\_\_\_\_ E-mail \_\_\_\_\_

Просьба поставить отметку в соответствующих квадратах:

Нуждаетесь ли Вы в гостинице:  да  нет

Тип номера:  одноместный  одно место в двухместном номере

Дата приезда \_\_\_\_\_ Дата отъезда \_\_\_\_\_

*Продолжение информации на стр. 125*